

BEST AVAILABLE COPY
日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1989年3月1日

出願番号
Application Number: 平成1年特許願第49636号

出願人
Applicant(s): 第一化学薬品株式会社
第一製薬株式会社
松尾壽之



RECEIVED
NOV 26 PM 3:50
GROUP 130

1990年3月23日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

吉田文毅



出証平 2-13798

特 許 願

平成元年 3 月 1 日

(14,000 円)

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1. 発明の名称

新規DNA フラグメント

2. 請求項の数 5

3. 発 明 者

居 所 東京都中央区日本橋3丁目13番5号

第一化学薬品株式会社内

氏 名 須 藤 哲 司 (ほか4名)

4. 特許出願人

住 所 東京都中央区日本橋3丁目13番5号

名 称 第一化学薬品株式会社

代表者 佐 藤 知 道

(ほか2名)

5. 代 理 人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 (〒103)

共同ビル 電話 (669) 0904番 (代)

氏 名 (6870) 弁理士 有 賀 三 幸

(ほか2名)

6. 添付書類の目録

- | | |
|-------------|-------|
| (1) 明 細 書 | 1 通 |
| (2) 願書の副本 | 1 通 |
| (3) 委 任 状 | 各 1 通 |
| (4) 図 面 | 1 通 |
| (5) 微生物受託証写 | 1 通 |

7. 前記以外の発明者、特許出願人および代理人

(1) 発 明 者

居 所 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号

第一製薬中央研究所内

氏 名 前 川 啓 二

住 所 宮崎県宮崎郡清武町大字木原5618番地

氏 名 南 野 直 人

住 所 宮崎県宮崎郡清武町大字加納甲字櫛間1520-24

氏 名 寒 川 賢 治

住 所 宮崎県宮崎郡清武町大字木原6653番地

氏 名 松 尾 壽 之

(2) 特許出願人

住 所 東京都中央区日本橋三丁目14番10号

名 称 (283) 第一製薬株式会社

代表者 鈴 木 正

住 所 宮崎県宮崎郡清武町大字木原6653番地

氏 名 松 尾 壽 之

(3) 代 理 人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 (〒103)

共同ビル 電話 (6 6 9) 0 9 0 4 番 (代)

氏 名 (7 7 5 6) 弁理士 高 野 登志雄

住 所 同 上

氏 名 (9 6 7 3) 弁理士 中 嶋 俊 夫

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

新規 DNA フラグメント

2. 特 許 請 求 の 範 囲

1. ヒト由来の脳性ナトリウム利尿ペプチドをコードする塩基配列を含んでなる DNA フラグメント。

2. ヒト由来の脳性ナトリウム利尿ペプチドが次のアミノ酸配列よりなるものである請求項 1 記載の DNA フラグメント。

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser
Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln
Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu
Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro

Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val
Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly
Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr
Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met
Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys
Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu

Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His

3. ヒト由来の脳性ナトリウム利尿ペプチドが次のアミノ酸配列よりなるものである請求項1記載のDNAフラグメント。

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala
Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu His Leu Ala
Phe Leu Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly
Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr
Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu
Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu
Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser
Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg
Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His
Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala

Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser
Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile
Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val
Leu Arg Arg His

4. 次の塩基配列を有するものである請求項1または2記載のDNAフラグメント。

CAC CCG CTG GGC AGC CCC GGT TCA GCC TCG
GAC TTG GAA ACG TCC GGG TTA CAG GAG CAG
CGC AAC CAT TTG CAG GGC AAA CTG TCG GAG
CTG CAG GTG GAG CAG ACA TCC CTG GAG CCC
CTC CAG GAG AGC CCC CGT CCC ACA GGT GTC
TGG AAG TCC CGG GAG GTA GCC ACC GAG GGC
ATC CGT GGG CAC CGC AAA ATG GTC CTC TAC
ACC CTG CGG GCA CCA CGA AGC CCC AAG ATG
GTG CAA GGG TCT GGC TGC TTT GGG AGG AAG
ATG GAC CGG ATC AGC TCC TCC AGT GGC CTG
GGC TGC AAA GTG CTG AGG CGG CAT

5. 次の塩基配列を有するものである請求項1
または3記載のDNAフラグメント。

ATG GAT CCC CAG ACA GCA CCT TCC CGG GCG
CTC CTG CTC CTG CTC TTC TTG CAT CTG GCT
TTC CTG GGA GGT CGT TCC CAC CCG CTG GGC
AGC CCC GGT TCA GCC TCG GAC TTG GAA ACG
TCC GGG TTA CAG GAG CAG CGC AAC CAT TTG
CAG GGC AAA CTG TCG GAG CTG CAG GTG GAG
CAG ACA TCC CTG GAG CCC CTC CAG GAG AGC

CCC CGT CCC ACA GGT GTC TGG AAG TCC CGG
GAG GTA GCC ACC GAG GGC ATC CGT GGG CAC
CGC AAA ATG GTC CTC TAC ACC CTG CGG GCA
CCA CGA AGC CCC AAG ATG GTG CAA GGG TCT
GGC TGC TTT GGG AGG AAG ATG GAC CGG ATC
AGC TCC TCC AGT GGC CTG GGC TGC AAA GTG
CTG AGG CGG CAT

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は生理活性ペプチドの生産に有用な新規DNAフラグメントに関し、更に詳しくはヒト脳性ナトリウム利尿活性のあるペプチド（ヒトBNP）をコードする塩基配列を含有するDNAフラグメントに関する。

〔従来の技術〕

1983～1984年にラットおよびヒトの心房より分泌される新しいナトリウム利尿ペプチドの構造決定が次々に発表された〔例えば、：
Biochem. Biophys. Res. Commun., 117,
859 (1983) ; Biochem. Biophys. Res. Commun.,

1 1 8 , 1 3 1 ~ 1 3 9 (1984)] 。これらのペプチドは心房性ナトリウム利尿ペプチド（以下、ANP という）と命名され、強力なナトリウム利尿作用、血管平滑筋弛緩作用を有し、新しいタイプのペプチド系循環器用薬剤として注目されている。

一方、1988年にはブタの脳より新しい利尿ペプチドが単離精製され、構造決定もされ、ブタ脳性ナトリウム利尿ペプチド（以下、ブタBNP という）と命名された [Nature , 3 3 2 , No.6159, 7 8 ~ 8 1 (1988) ; Biochem. Biophys. Res. Commun. , 1 5 5 , 7 2 6 ~ 7 3 2 (1988)] 。脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) の薬理作用はANP とほとんど同じであり、利尿作用、ナトリウム利尿作用、血圧降下作用、ヒヨコ直腸弛緩作用等を有し、その比活性もANP とほぼ同等である。ただし直腸弛緩活性はBNPの方がANPより3~4倍高い。このような性質よりBNPも新しいペプチド系循環器用薬剤として期待されている。また、ブタBNPについては、DNAレベルの研究も行なわれ、ブタBNPおよびその前駆体をコードする塩基配列

を有する cDNA のクローニングが報告されている

[Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 410 (1988)]。

〔発明が解決しようとする課題〕

ところで BNP はヒトの疾患治療薬として用いるものであるため、抗原性等の問題よりヒト由来の BNP の開発が要望されていた。しかし、ヒト由来の BNP については蛋白、ペプチドのレベルでも、DNA のレベルでもその存在および構造が未だ証明されていない。

〔課題を解決するための手段〕

かかる実情において、本発明者らはヒト由来の BNP (ヒト BNP) を取得すべく種々検討してきたところ、ブタ BNP 前駆体をコードする cDNA フラグメントをプローブとして用い、ヒト組織の cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、該ヒト組織中より BNP をコードする cDNA をクローニングすることに成功し、本発明を完成した。

すなわち、本発明はヒト由来の脳性ナトリウム利尿ペプチドをコードする塩基配列を含んでなる

DNA フラグメントを提供するものである。

本発明のDNAフラグメントは例えば次のようにして調製される。

まず、ヒトBNPが含有されていると考えられるヒト組織より全RNAを分離し、これよりmRNAを精製し、常法によりcDNAライブラリーを構築する。次いでこのcDNAライブラリーよりブタBNP前駆体をコードするDNAフラグメントをプローブとするハイブリダイゼーションによってヒトBNPクローンをスクリーニングすれば、本発明のDNAフラグメントが得られる。以下に本発明DNAフラグメントの製法について説明する。

(1) cDNAライブラリーの構築

mRNAを調製するためのヒト組織としては、ヒト脳、ヒト心房等が用いられる。RNAの分離は、例えばヒト心房断片をグアニジルチオシアネートとともにホモジナイズし、トリフルオロ酢酸セシウム平衡密度勾配超遠心により行うことができる。mRNAの精製はオリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーにて常法により行われる。得られ

た mRNA より cDNA を合成するには、例えば cDNA 合成キット（ファルマシア製）を用いる方法、岡山ーベルグ（Berg）の方法、グラブラーとホフマンの方法やその変法、他の市販のキットなどを用いて常法により行われる。得られた cDNA に制限酵素 BcoRI アダプターを付加後、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ等で 5' 端をリン酸化してベクター（例えば λ gt10）とライゲーションし、さらにインビトロパッケージングをすることにより、cDNA ライブラリーを構築する。

(2) ヒト BNP クローンのスクリーニング

ヒト BNP クローンのスクリーニングは、ブタ BNP の cDNA 断片のラベル体をプローブとして用いて行なわれる。この cDNA 断片はブタ BNP の cDNA クローニング [Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 410 (1988)] の過程で得られた不完全長のクローンである pBNP-82 (320bp) を制限酵素 Xho I と Rsa I で消化して得られる 120bp 断片（ブタ BNP の活性部位であるブタ BNP - 26（アミノ酸 26 残基からなる）とその上流 30bp

を含む DNA 断片) であり、プローブはこの cDNA 断片を ^{32}P でラベルして調製される。該プローブと前述の cDNA ライブラリーをハイブリダイズせしめ、陽性クローンを選択する。選択された陽性クローン λ hBNP-57 を制限酵素で切断すれば本発明の DNA フラグメントが得られる。

得られた DNA フラグメントの塩基配列の決定は、常法例えば DNA フラグメントをシーケンシング用ベクターに組み込み、p hBNP-57 を作成し、ついで cDNA 領域の制限酵素地図を作成し、さらに適当な長さに切断する制限酵素を用いて得られる DNA 断片をそれぞれシーケンシング用ベクターに組み込み直してサブクロニングし、サンガーらの方法によって全塩基配列を決定することができる。

かくして決定された本発明 DNA の塩基配列およびヒト BNP のアミノ酸配列は第 2 図に示す通りである。第 2 図の塩基配列のうち、1 ~ 402 はアミノ酸数 134 残基よりなるヒト BNP プレ前駆体ポリペプチドをコードし、このうち 79 ~ 402

はアミノ酸数 108 残基よりなるヒト BNP 前駆体ポリペプチドをコードすると考えられる。このことは前駆体の前にあるシグナルペプチドの構造がブタとヒトとで非常によく似ており、また Arg-Ser-His-Pro-Leu-Gly (塩基番号 73-90 に対応) のアミノ酸配列がブタ BNP にも同様にありこの中の Ser-His の結合が切れてブタ BNP 前駆体が生成している [Biochem. Biophys. Res. Commun., 157, 410 (1988)] ことから判断した。またこのうち 307~402 はアミノ酸数 32 残基よりなるヒト BNP-32 をコードすると考えられる。このことはまだヒト BNP がペプチドとして単離されていないため断定はできないが前駆体からプロセッシングを受けヒト BNP が生成すると考えられる。ブタの場合ブタ BNP-26 (アミノ酸 26 残基よりなる) [Nature, 332, 78~81 (1988)] ブタ BNP-32 (アミノ酸 32 残基よりなる) [Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 726~732 (1988)] が単離され、ANP においてもヒトではヒト α ANP (アミノ酸

28 残基よりなる) [Biochem. Biophys. Res. Commun., 118, 131~139 (1984)] ラットではラット α ANP (アミノ酸 28 残基よりなる) [Biochem. Biophys. Res. Commun., 117, 859-865 (1983)] が単離されている。これらはすべてその前駆体に存在する Arg および Pro-Arg 後で切断され生成されている。ヒト BNP の場合活性に必要と思われる Cys (112 番目) から His (134 番目) の 23 アミノ酸残基からなるペプチドの前に存在する Arg が 102 番目の Arg であり ProArg の構造をもっていることからこの後でプロセッシングを受けアミノ酸数 32 残基よりなるヒト BNP - 32 が生成すると考えた。

また ANP の場合前駆体にも生理活性があることが判っておりヒト BNP の場合も同様と考えられ、医薬品として考えた場合前駆体、ヒト BNP - 32 どちらも有用な物質である。

なお、全長 DNA 及びそれに対応するアミノ酸の配列は図 2 に示した通りであるが、必ずしも全長ペプチドのみがヒト BNP 活性を示すものではない。

すなわち、この全長 DNA で産生させる全長のペプチドのみが有用であるとは限らず、例えば C 端が短縮されたものを得ることもある。あるいは部分的にアミノ酸をコードするコドンに入れ換えてヒト BNP 活性を示すペプチドを産生させることもできる。さらに、それらのアミノ酸配列をコードする DNA 配列は一種類に限らないことは常識であり、一旦全長 DNA を特定すれば種々の変種 DNA を作りこれを用いてヒト BNP 活性を有するペプチドを産生させることができる。従って本発明で意味するヒト由来の脳性ナトリウム利尿ペプチド（ヒト BNP）とは全長ヒト BNP に限定されず BNP 活性を有しているペプチドのことであり、ヒト由来の脳性ナトリウム利尿ペプチドをコードする塩基配列とはそれらをコードする塩基配列を意味する。

〔発明の効果〕

本発明 DNA フラグメントを用い、常法により発現ベクターを導入し、発現させることによりヒト BNP、ヒト BNP 前駆体、さらにはそれらと生物学的活性を同じくする各種ペプチドを産生させるこ

上流 30 bpを含む DNA 断片) をアクリルアミドゲル電気泳動で精製して調整した。まずブランクをナイロンフィルターにトランスファーし、アルカリ処理後中和して紫外線照射で DNA を固定した。5 × デーンハーツ (Denhardt's) 溶液、100 μ g / ml の変性サケ精子 DNA 及び 0.1 % SDS を含む 4 × SSC 溶液 0.6M NaCl と 0.06M クエン酸 3 ナトリウムにフィルターを浸して 60 °C で 3 時間プレハイブリダイゼーションした。引き続き Random primed DNA ラベリングキット (ベーリンガー・マンハイム社製) によって 32 P でラベルしたプローブを 2 × 10⁶ cpm / ml になるようにハイブリダイゼーション液 (プレハイブリダイゼーション液と同一組成) に加え、その中でフィルターを 60 °C で一昼夜インキュベートした。

次にフィルターを 0.1 % SDS を含む 2 × SSC 溶液で洗浄し、風乾後、オートラジオグラフィーに供した。

これにより 55 個のハイブリダイゼーションポジティブブランクを得た。この 55 個のポジティブ

ブブランクがヒト ANP をコードする DNA (6 8 0 bp) をプローブとしてハイブリダイズするか否か試みたところ、すべて陰性であった。この結果、この cDNA は公知のヒト ANP をコードする cDNA とは異なることが明らかである。上記 5 5 個のポジティブブランクをモノクローン化し、ついで常法により λ フェージ DNA を調製した。これを制限酵素 EcoRI で切断して得られる DNA 断片を調べたところ、 λ hBNP-57 と命名したクローンに最長約 7 0 0 bp の cDNA が挿入されていた。このインサート cDNA をシーケンス用ベクターであるブルースクリプト (Blue Script (KS(+)) , ストラタジーン製) に組み込み phBNP - 57 を作成した。このプラスミドを含有する大腸菌は E. coli HB101 /

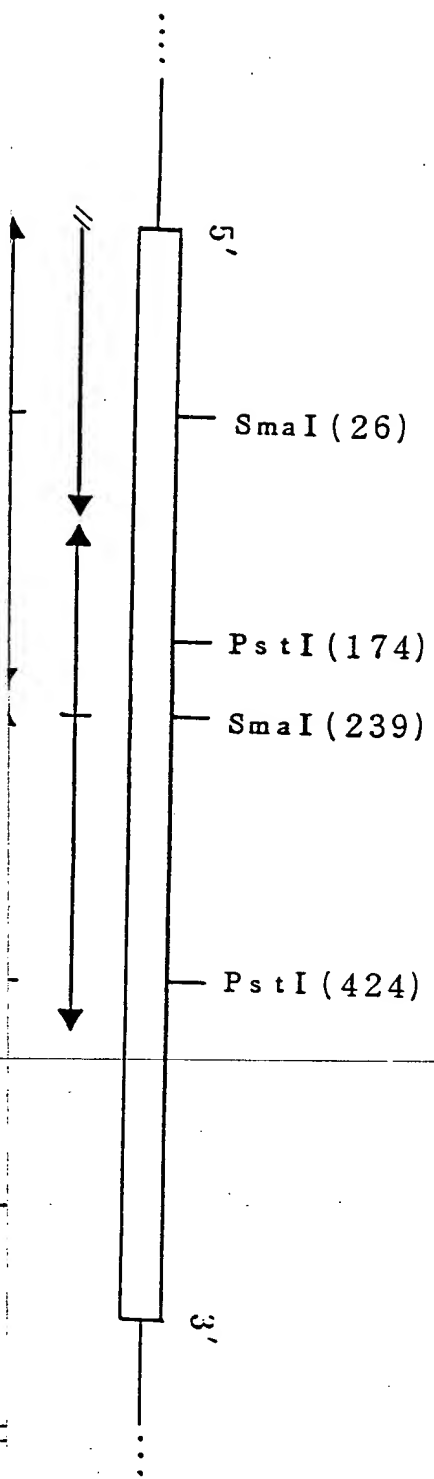
phBNP - 57 と命名し、微工研に微工研条寄第 2 2 9 9 号 (FERMBP-2 2 9 9) として寄託した。ついでこの cDNA 領域の制限酵素地図を作成した。更に適当な長さに切断される制限酵素を用いて cDNA 断片を得、それぞれをブルースクリプトに組み直してサブクローニングした。

挿入 cDNA 領域の制限酵素切断部位と塩基配列決定のストラテジーを第 1 図に示す。塩基配列はサンガーらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463~5467 (1977)) を用いて決定した。

第 2 図にこの cDNA の塩基配列及びその塩基配列に対応するアミノ酸配列を示す。

該挿入 DNA の配列は翻訳開始コドン ATG からはじまり翻訳終止コドン TAA で終る長い翻訳可能領域を有する。全長 692 bp であるこの cDNA は塩基対番号 -99 ~ -1 までは 5' 側非翻訳領域であり、1 ~ 78 まではシグナルペプチドをコードし、79 ~ 402 はヒト BNP 前駆体をコードしていると考えられる。そのうち 307 ~ 402 はヒト BNP -32 (アミノ酸 32 残基よりなる) をコードしていると考えられる。また 403 ~ 593 は 3' 側非翻訳領域である。

この中で、ヒト BNP -32 をコードしている 307 ~ 402 の塩基配列に対応するアミノ酸配列はそのうちのアミノ酸 17 残基がシステインのジスルフィド結合でつくる環状構造をもちブタ



出願人 第一
第一
松
代理人 弁理士

出願人 第一化学薬品株式会社

第一製薬株式会社

松 尾 壽 之

代理人 弁理士 有 賀 三 幸

(ほか2名)